

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(54) PRODUCTION OF SYMMETRICAL TRIGLYCERIDE WITH HIGH-MOLECULAR WEIGHT LIPASE

(11) 63-240790 (A) (43) 6.10.1988 (19) JP
 (21) Appl. No. 62-45302 (22) 2.3.1987 (33) JP (31) 86p.45270 (32) 4.3.1986
 (71) JAPANESE RES & DEV ASSOC BIO REACTOR SYST FOOD IND
 (72) SUMITAKA KOKUSHO(3)
 (51) Int. Cl. C12P7/64//C12N9/20(C12N9/20,C12R1:05)(C12N9/20,C12R1:025)(C12N9/20,C12R1:38)

PURPOSE: To produce a symmetrical triglyceride represented by cacao fat and having high added value, in high efficiency and ester interchange ratio, from an oil and fat and a fatty acid or its ester, by using a high-molecular weight microbial lipase having 1,3-site specificity.

CONSTITUTION: A symmetrical triglyceride is produced by carrying out ester interchange reaction of (A) a raw material oil and fat glyceride having unsaturated or saturated fatty acid at 2-site with (B) a 4~22C saturated or unsaturated fatty acid (or its 1~20C alkanol ester) opposite to the 2-site fatty acid of the glyceride in the unsaturation or saturation in the presence of (C) an organic solvent excluding ≥ 1 -valent primary or secondary alcohol solvent under the action of (D) a lipase produced by bacteria of *Alcaligenes* genus, *Achromobacter* genus or *Pseudomonas* genus and having 1,3-site specificity, a molecular weight of $\geq 100,000$ and an optimum pH of ≥ 8.0 .

(54) PRODUCTION OF LIPID BY FUNGI OR ALGAE

(11) 63-240791 (A) (43) 6.10.1988 (19) JP
 (21) Appl. No. 62-75686 (22) 27.3.1987
 (71) KANEGAFUCHI CHEM IND CO LTD (72) HIDEKI FUKUDA
 (51) Int. Cl. C12P7/64

PURPOSE: To produce a lipid in high efficiency, by using fungi or algae capable of synthesizing lipid or said fungi or algae of immobilized state and carrying out the reaction in the presence of a surfactant in the reaction system.

CONSTITUTION: Fungi or algae having biosynthesizing capability of lipid or an immobilized microorganism produced by adsorbing and immobilizing said microorganisms to a porous material having a porosity of 70~99% and a pore number of 2~50/cm per unit length or to a worked metallic material having a porosity of 70~99% is introduced into a reactor containing a nutrient medium and reacted in the presence of 0.05~8%, preferably 0.3~3% nonionic surfactant having an HLB value of 7~20 under aeration with air, oxygen or their mixture.

(54) PRODUCTION OF MENAQUINONE-4 BY FERMENTATION

(11) 63-240792 (A) (43) 6.10.1988 (19) JP
 (21) Appl. No. 62-75661 (22) 28.3.1987
 (71) KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD (72) TAKEMITSU ARAI(2)
 (51) Int. Cl. C12P7/66//C12N1/20

PURPOSE: To produce menaquinone-4 participating in the coagulation of blood and control of calcium in living body, in high efficiency, by culturing a menaquinone-4-producing microorganism in a medium containing lactose as a carbon source.

CONSTITUTION: *Corynebacterium liquefaciens* ATCC 14929, etc., are cultured in a medium containing 5~200g/l, preferably 20~180g/l of glucose as a carbon source in addition to nitrogen source, inorganic salts, minor element, etc., at 20~40°C, preferably 25~35°C and pH 5~9, preferably about 7 for 3~7 days under aerobic condition and the objective menaquinone-4 is separated from the cultured product using a solvent, etc.

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-240791

⑤ Int.Cl.⁴

C 12 P 7/64

識別記号

庁内整理番号

7236-4B

④ 公開 昭和63年(1988)10月6日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全8頁)

⑭ 発明の名称 カビ類または藻類による脂質の製造法

⑰ 特 願 昭62-75686

⑱ 出 願 昭62(1987)3月27日

⑲ 発 明 者 福 田 秀 樹 兵庫県高砂市西畑1丁目16番25号

⑳ 出 願 人 鐘淵化学工業株式会社 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

㉑ 代 理 人 弁理士 朝日奈 宗太 外1名

明 細 書

1 発明の名称

カビ類または藻類による脂質の製造法

2 特許請求の範囲

1 脂質生合成能を有するカビ類または藻類を用いて脂質を生成せしめるに際し、反応系にHLBの値が7~20である非イオン性界面活性剤を存在させて反応を行なうことを特徴とする脂質の製造法。

2 脂質生合成能を有するカビ類または藻類の固定化微生物粒子を用いて脂質を生成せしめるに際し、反応系にHLBの値が7~20である非イオン性界面活性剤を存在させて反応を行なうことを特徴とする脂質の製造法。

3 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、脂質生合成能を有するカビ類もし

くは藻類、または同カビ類もしくは藻類の固定化微生物粒子を用いて脂質を生成せしめるに際し、反応系に界面活性剤を存在させて反応を行なうことを特徴とする脂質の製造法に関する。

〔従来技術〕

微生物菌体の脂質はそれ自体油脂原料として、また脂質の精製によってえられる各種ステロールや各種高級脂肪酸などの有用物質は食品用、医薬用、または一般工業用として幅広い用途に適用できるので、従来より脂質生産性を高めた望ましい組成の脂質を生産させる技術に関して活発な研究開発が続けられてきた。とくに最近では、このような脂質から回収される不飽和脂肪酸のうちアラキドン酸やγ-リノレン酸が多様な生理活性を有することが明らかになりつつあり、ますます注目を集めている。従来このような脂質の製造方法としては、カカオ脂類似の油脂の製造法(特開昭60-75292号)、アラキドン酸の製造法(特開昭52-64482号、バイオテクノロジー・アンド・バイオエンジニアリング

(Biotechnology and Bioengineering)、25巻、1057(1983)) および γ -リノレン酸の製造法(特公昭47-22280号、同58-22199号)などを示すことができる。

〔発明が解決しようとする問題点〕

しかしながら、このような製造法では各種微生物体内の脂質蓄積量は制限を受け、充分量生産することは不可能であり、しかも脂質の大部分が菌体内に蓄積されるので、これらを回収するためには菌体を破砕処理したり酸処理したりするなどの複雑な抽出処理が必要となっていた。このような抽出処理を用いれば抽出される多量の不純物の存在によって精製プロセスがきわめて複雑になり、工業化を推進するうえで大きな障害要因となっていた。したがって、脂質を高収量で製造でき、しかも回収が容易な新しい製造プロセスの開発が強く望まれていた。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明者は、このような観点から鋭意研究を重ねた結果、反応系に界面活性剤を存在させな

がら反応を行えば菌体内に蓄積した脂質を菌体外、すなわち反応液中や菌体の外表面壁に著量分泌させることができ、脂質が高収量でしかも容易に回収できること、さらに反応系に界面活性剤を存在させながら反応を行なう際に脂質生合成能を有するカビ類または藻類の固定化微生物粒子を用いれば反応器中の微生物濃度を高濃度に維持できるのでより高収量に、また効率よく脂質を生産することができることを見出し本発明を完成するにいたった。

すなわち、本発明は脂質生合成能を有するカビ類または藻類を用いて脂質を生成せしめるに際し、反応系にHLBの値が7~20である非イオン性界面活性剤を存在させて反応を行なうことを特徴とする脂質の製造法および脂質生合成能を有するカビ類または藻類の固定化微生物粒子を用いて脂質を生成せしめるに際し、反応系にHLBの値が7~20である非イオン性界面活性剤を存在させて反応を行なうことを特徴とする脂質の製造法に関する。

たとえば、アラキドン酸や γ -リノレン酸などの種々の生理活性を示す不飽和脂肪酸なども高収量で生産できるものである。

本発明のごとく、脂質を効率よく菌体外に分泌させしめる方法は本発明が最初のものである。

〔作用および実施例〕

本発明は、脂質生合成能を有するカビ類もしくは藻類、または同カビ類もしくは藻類の固定化微生物粒子を用いて脂質を生成せしめるに際し、反応系にHLBの値が7~20である非イオン性界面活性剤を存在させて反応させることを特徴とする脂質の製造法であって、本発明によって反応液中や菌体の外表面壁に多量の脂質を分泌させしめることができる。このような脂質が菌体外にスムーズに移行する理由は明らかではないが、界面活性剤を適切な条件下で反応液中に存在させれば界面活性剤は微生物の生育に何ら悪影響を与えることなく微生物の細胞表面に作用して、細胞膜の透過性を改善するものと思われる。このようにしてえられた反応液中や菌

体の外表面壁の脂質は従来より公知の抽出および精製方法によって容易に高純度の油脂、各種ステロールおよび各種高級脂肪酸などを回収することができる。

本発明に使用しうる微生物としては、脂質生合成能を有するカビ類または藻類であればよく任意に選択して用いることができるが、(1)アスペルギルス属(*Aspergillus*)、(2)フザリウム属(*Fusarium*)、(3)ペニシリウム属(*Penicillium*)、(4)ボルピリジウム属(*Porphyridium*)、(5)ムコール属(*Mucor*)、(6)リゾプス属(*Phizopus*)、(7)アブシディア属(*Absidia*)、(8)アクチノムコール属(*Actinomucor*)、(9)コアネフォラ属(*Choanephora*)、(10)カニングメラ属(*Cunninghamella*)、(11)ピコマイセス属(*Phycomyces*)、(12)リゾムコール属(*Rhizomucor*)、(13)ヘリコスチラム属(*Helicostylum*)、(14)パエシロマイセス属(*Paecilomyces*)、(15)シンセファラストラム属(*Syncephalastrum*)、(16)サルシネラ属

(*Circinella*)、⑦ゴングロネラ属 (*Gongronella*)、⑧バクセラ属 (*Backusella*)、⑨ピチウム属 (*Pythium*)、⑩フェネロマイセス属 (*Fennellomyces*)、⑪モルティエレラ属 (*Mortierella*)、⑫スピルリナ属 (*Spirulina*)、⑬クラドスポリウム属 (*Cladosporium*)、⑭トリコデルマ属 (*Trichoderma*)、⑮ペリキュラリア属 (*Pellicularia*)、⑯グリオクラディウム属 (*Gliocladium*)、⑰ヒュミコラ属 (*Humicola*)、⑱クラビセプス属 (*Claviceps*) および⑲クロレラ属 (*Chlorella*) などとその代表的なものとしてあげることができる。とくにアラキドン酸やγ-リノレン酸については(1)~⑫に属する微生物などから選択するのが含有量の点から好ましい。

さらに具体的にそれぞれの属に対する代表的菌株例をあげれば、アスペルギルス・カンディダス (*A.candidus*) IFO 4309、フザリウム・オキソポラム (*F.oxysporum*) IFO 5942、ペニシリウム・スピヌロサム (*P.spirulosum*) IFO 5793、ボ

ンデリ (*F.linderi*) IFO 6409、モルティエレラ・イサベリナ (*M.isabellina*) IFO 7824、モルディエレラ・エロンガータ (*M.elongata*) IFO 8570、スピルリナ・プラテンシス (*S.platensis*)、クラドスポリウム・ヘルバラム (*C.herbarum*) IFO 6348、トリコデルマ・ビリデ (*T.viride*) IFO 9066、ペリキュラリア・フィラメントサ (*P.filamentosa*) IFO 6476、グリオクラディウム・ビレンス (*G.virens*) IFO 9169、ヒュミコラ・グリゼー (*H.grisea*) IFO 4868、クラビセプス・プルブレア (*C.purpurea*) IFO 5782 およびクロレラ・ピレノイドサ (*C.pyrenoidosa*) がある。

このような微生物の培養条件としては各種微生物が生育できる条件であればとくに制限はなく、カビ類に対してはグルコース、糖蜜またはシュクロースなどの炭水化物、エタノール、酢酸やn-アルカン、n-デカン、ヘキサデカンまたはヘプタデカンなどの炭化水素類を炭素源とし、その他必要な栄養源を添加した培地が一般に用いられ、温度、pHおよび反応時間などの条件は

ルピリジウム・クルエンタム (*P.cruentum*)、ムコール・アンビガウス (*M.ambiguus*) IFO 6742、リゾプス・オリゼー (*R.oryzae*) IFO 5418、リゾプス・ストロニファー (*R.stolonifer*) IFO 4781、アブシディア・コエルレア (*A.coerulea*) IFO 4011、アクチノムコール・レベンス (*A.repens*) HUT 1049、コアネフォラ・シルシナンス (*C.circinans*) IFO 5991、カニンガメラ・エチヌレータ・エレガンス (*C.echinuleta* var. *elegans*) IFO 4441、ピコマイセス・ニテンス (*P.nitens*) IFO 5694、リゾムコール・ミーヘイ (*R.miohei*) IFO 9740、ヘリコスチラム・ニグリカンス (*H.nigricans*) IFO 8091、バエシロマイセス・バリオチ (*P.variotti*) HUT 4028、シンセファラストラム・ニグリカンス (*S.nigricans*) HUT 1229、サルシネラ・リジダ (*C.rigida*) IFO 6411、ゴングロネラ・ブトレリ (*G.butleri*)、IFO 8080、バクセラ・シルシナ (*B.circina*) IFO 9231、ピチウム・デバリアナム (*P.debaryanum*) IFO 5919、フェネロマイセス・リ

各種微生物に適した条件に準ずればよい。また藻類に対しても一般に知られる無機栄養源を基本培地とし適切な光照射度、温度、pHおよび反応時間などの培養条件に準ずればよい。

本発明の反応系に存在させる界面活性剤は陽イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤または両性イオン界面活性剤の種々の界面活性剤のうち、非イオン性界面活性剤が微生物の増殖をあまり阻害することなく、しかも脂質の透過作用を効果的に促進させるのでとくに効果的である。

非イオン性界面活性剤としては(1)ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、(2)ポリエチレングリコール脂肪酸エステル、(3)ポリオキシエチレンアルキルエーテル、(4)ソルビタン脂肪酸エステル、(5)ポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステル、(6)ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、(7)オキシエチレンオキシプロピレンブロックポリマーおよび(8)ポリオキシエチレンアルキルアミンに属するものの

ほか、非イオン性界面活性剤の性質を有するものが用いられるが、とくに(1)～(3)に属し、HLBの値が7～20の範囲にあるものが効果的である。ここで、HLBとは一般的に使用される親水性-親油性の均衡を数値的に示したもので、界面活性剤の両極性構造の性質を定量的に表わしたものである。HLBが7未満のばあいには界面活性剤と微生物とがあまりよく接触せず、20より大きいばあいには脂質の透過作用への影響が弱いという傾向がある。具体的に本発明に用いる非イオン性界面活性剤の代表的なものとしては、(1)についてはポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートとして、たとえばノニオンLT-221(商品名、日本油脂製)、レオドールTV-L120(商品名、花王製)およびツイーン20(商品名、半井化学薬品製)など、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテートとして、たとえばレオドールTV-P120(商品名、花王製)およびツイーン40(商品名、半井化学薬品製)など、ポリオキシエチレンソルビタンモノステ

0.3～3重量%である。非イオン系界面活性剤の量が0.05重量%未満では脂質を反応液中や菌体の外表面壁に分泌させしめるための細胞膜への影響が効果的でなく、8重量%より大きいばあいでは細胞膜や微生物の生育に好ましくない影響を与える。したがって、かかる条件下において脂質が反応液中や菌体の外表面壁に著量分泌する。

本発明においては、通常のサスペンション系での回分、半回分、連続培養などの各種培養方法はもちろん適用できるが、上記微生物を固定化した固定化微生物を用いるとより効率的である。固定化の方法は、ゲル化剤を用いる包括固定化法および微生物保持材料を用いる物理吸着固定化法のいずれをも適用できるが、後者の方が、反応速度が大きくしかも高価なゲル化剤を使用しないなどの理由から経済性にすぐれ工業化に有利である。

微生物保持材料としては、カビ類や藻類の持つ粘着力により固定化を可能ならしめる任意の

アレートとして、たとえばレオドールTV-S120(商品名、花王製)など、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートとして、たとえばノニオンOT-211(商品名、日本油脂製)、レオドールTV-O120およびTV-O106(商品名、花王製)およびツイーン80(商品名、半井化学薬品製)など、ポリオキシエチレンソルビタントリオレエートとして、たとえばレオドールTV-O320(商品名、花王製)など、(2)についてはエマノーン1112、3299および3199(商品名、花王製)など、また(3)についてはエマルゲン810(商品名、花王製)などがあげられる。

本発明において界面活性剤は反応の初期から添加してもよく、反応の途中または終期に添加し効果的に脂質を反応液中や菌体の外表面壁に移行させてもよい。もちろん、これら界面活性剤の添加により発泡がはげしいばあいには通常用いられる消泡剤を適量添加すればよい。

本発明の反応系に存在させる非イオン性界面活性剤の量は、0.05～8重量%、好ましくは

材料が適用できる。たとえば、高分子多孔質材料としては、ポリエチレンまたはポリプロピレンなどのポリオレフィン系；ブタジエンまたはイソブレンなどのジエン系；ポリウレタン；ポリ塩化ビニル、アクリルアミドまたはポリスチレンなどのビニル系重合体；ポリエーテル、ポリエステル、ポリカーボネートまたはナイロンなどの縮合系；シリコンおよびフッ素樹脂などの材料、無機材料としては、セラミックス、ガラス、活性炭、軽石および金属類などが適用できるが、いずれの材料においてもカビ類や藻類を良好に該微生物保持材料に固定化させるためには、空げき率が70～99%、単位直線長さ当りの孔数が2～50個/cmの範囲である多孔質材料か、空げき率が70～99%である金属加工材料などを使用するのが好ましい。

通常、前記にあげた微生物はベレット状または菌糸状などの種々の様相を呈するが、上記の特徴を有する保持材料を適用すれば、微生物が増殖をくり返す過程において、微生物固有の粘

着力や保持材料の包括作用などによって吸着固定化される。このような各種保持材料は、微生物の種類および反応条件などによって適宜選択でき、形状についてはたとえば球状、ブロック状、リング状、筒状またはシート状などに加工し使用することができる。寸法については、微生物の種類、反応条件および反応器の種類などにより決定できるが、おおむね球状のものであれば直径1~100 μ m、ブロック状のものであれば一辺が1~100 μ mのものが使用される。

微生物を上記保持材料に固定化させるには、通常、公知の回分、半回分、連続培養法などを用いて容易に吸着固定化させることができる。1例を示すと、あらかじめ蒸気などで殺菌された空の該保持材料と微生物を好ましい反応条件下、たとえばムコール・アンピガウスIFO 6742をグルコースを基本培地とし、初発pH 6.0、温度30℃で通気培養すれば、約100時間後には該微生物が保持材料に吸着され、反応に適した固定化微生物が形成される。このような固定化法

製する常法、たとえば溶媒抽出により回収でき、さらに各種高級脂肪酸はクロマトグラフィーなどの公知の分離精製法により高純度の製品としてうるることができる。また、菌体の外表面壁に付着したり残存している菌体中の脂質もホモジナイズなどの処理を行ない同様に各種有用物質として回収することができる。

つぎに本発明を実施例によりさらにくわしく説明するが、本発明はもとよりこれらに限られるものではない。

以下の実施例においては生成した反応液中の脂質はクロロホルムによる溶媒抽出後、常法の重量法によって分析した。各種高級脂肪酸は溶媒抽出後、加水分解およびメチルエステル化を施した後、ガスクロマトグラフィーにより分析を行なった。菌体の外表面壁に付着した脂質や菌体中に残存する脂質についても菌体をホモジナイズしたのち、反応液のばあいと同様の操作によって分析した。

実施例 1

は他のカビ類や藻類についても同様に、好適な反応条件下で容易に固定化できる。

このような固定化微生物は、ひきつづき同一反応器で界面活性剤の存在下において回分、半回分または連続培養法などにより反応を行なわせる。すなわち、回分培養または半回分培養のばあい、培地を新しい培地と交換し、反応を継続する。このような交換操作をいく度くり返すことによって効率をより高めることができる。また連続培養のばあい、固定化後、新しい培地をポンプなどで連続的に送り込み、反応器の一方から連続的に注入速度と同じ割合で反応液を流出させればよい。

本発明においては、通気は空気、酸素または両者の混合ガスが用いられ、反応器は攪拌型または無攪拌型の各種気泡型のあらゆる型式のものが適用できるが、固定化微生物を用いるばあいには通常無攪拌型の反応器が操作面およびコスト面からより好ましい。

このようにしてえられた反応液中の脂質は精

ムコール・アンピガウスIFO 6742をグルコースが3%、 KH_2PO_4 が0.3%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ が0.2%、 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ が0.1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ が0.05%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ が0.001%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ が0.001%、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ が0.00002%、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ が0.0001%、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ が0.0001%、 NaCl が0.01%、酵母エキスが0.04%、麦芽エキスが0.04%およびポリブトンが0.02%の培地で初発pH 6.0、温度30℃にて約1週間振盪培養を行ない種母を調整した。500ml容のシェーカーフラスコに種母調整用培地と同じ培地100mlを入れ、上記種母とともに初発pH 6.0、温度30℃にて第1表に示す非イオン性界面活性剤(2.0重量%)の存在下で約1週間振盪培養を行なった。

ついで、えられた反応液中のヤーリノレン酸量、菌体から回収したヤーリノレン酸量を測定し、非イオン性界面活性剤の分類、商品名、製造元社名およびHLBの値とともにその結果および総ヤーリノレン酸量を示す。

なお、同じ培地および培養条件で界面活性剤無添加のものを対照とし、非イオン性界面活性剤の存在下のものと同様の方法にしたがって反応液中の γ -リノレン酸量、菌体から回収した γ -リノレン酸量を測定しその結果を第1表に示す。

第1表より、非イオン性界面活性剤のうち、とくにポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテルからなる群に属する界面活性剤のうち、HLBの値が7~20の範囲にあるものが、反応液中に γ -リノレン酸を分泌し、しかも総 γ -リノレン酸量が界面活性剤無添加の対照と比べかなり大きいことがわかる。

〔以下余白〕

第 1 表

| 分 類 | 商 品 名 | 製 造 元 社 名 | HLB (-) | (1)反応液中 γ -リノ レン酸 ($\mu\text{g}/\text{dQ}$) | (2)菌体から回 収した γ - リノレン 酸($\mu\text{g}/\text{dQ}$) | 総 γ - リノレン 酸(1)+(2) ($\mu\text{g}/\text{dQ}$) |
|---------------------------------|--------------|-----------|------------|---|--|---|
| ポリオキシエチレン ソルビタン脂肪酸エ ステル | レオドールTN-0120 | 花 王 | 15.0 | 1.41 | 13.9 | 15.3 |
| | レオドールTN-0108 | 花 王 | 10.0 | 1.62 | 14.8 | 16.4 |
| | レオドールTN-0320 | 花 王 | 11.0 | 2.84 | 17.7 | 20.5 |
| | レオドールTN-L120 | 花 王 | 16.7 | 1.30 | 16.1 | 17.4 |
| | ノニオンOT-221 | 日本油脂 | 15.0 | 1.55 | 16.6 | 18.2 |
| ポリエチレングコー ル脂肪酸エステル | エマノールN1112 | 花 王 | 13.7 | 2.30 | 14.5 | 16.8 |
| | エマノールN3199 | 花 王 | 19.1 | 1.59 | 13.1 | 14.7 |
| ポリオキシエチレン アルキルエーテル | エマルゲン 810 | 花 王 | 13.1 | 0.63 | 12.5 | 13.1 |
| ソルビタン脂肪酸 エステル | エマノールS-10(P) | 花 王 | 4.7 | 0 | 11.4 | 11.4 |
| | ノニオンOP-85R | 日本油脂 | 1.8 | 0 | 12.6 | 12.6 |
| | レオドールSP-030 | 花 王 | 1.8 | 0 | 13.1 | 13.1 |
| ポリオキシエチレン ソルビトール脂肪酸 エステル | レオドール 440 | 花 王 | 11.8 | 0 | 12.2 | 12.2 |
| ポリオキシエチレン アルキルフェニルエ ーテル | エマルゲン 908 | 花 王 | 10.8 | 0 | 9.7 | 9.7 |
| | エマルゲン 903 | 花 王 | 7.8 | 0 | 10.1 | 10.1 |
| | ノニオンNS-215 | 日本油脂 | 15.0 | 0 | 8.8 | 8.8 |
| | ノニポール 100 | 三洋化成工業 | 13.3 | 0 | 10.5 | 10.5 |
| オキシエチレンオキ シプロピレンプロッ クポリマー | プロノン 102 | 日本油脂 | - | 0 | 13.0 | 13.0 |
| | プロノン 201 | 日本油脂 | - | 0 | 10.5 | 10.5 |
| 対 照 | - | - | - | 0 | 12.0 | 12.0 |

実施例 2

ボルビリジウム・クルエンタムをのぞく第2表に示すカビ類を実施例1と同じ培地および同一条件にて、またボルビリジウム・クルエンタムについてはNaClが2.7%、KNO₃が0.1%、KH₂PO₄が0.007%、NaHCO₃が0.004%、MgSO₄・7H₂Oが0.66%、MgCl₂・6H₂Oが0.56%、CaCl₂・2H₂Oが0.15%、ZnCl₂が4×10⁻⁶%、H₃BO₃が6×10⁻⁵%、CoCl₂・6H₂Oが1.5×10⁻⁶%、CuCl₂・2H₂Oが4×10⁻⁶%、MnCl₂・4H₂Oが4×10⁻⁵%、Moが3.7×10⁻⁵%、FeCl₂・4H₂O(240mg/100ml 0.05M Na₂EDTA)が1ml/ℓおよび1Mトリス-HCl溶液(pH 7.6)が20ml/ℓの培地100mlに植菌し、温度20℃、蛍光灯による照度約8000ルクスにて、約10日間反応させた。非イオン性界面活性剤はレオドールTW-0 320(2.0重量%)の存在下で反応させた。また、同じ培地、培養条件で界面活性剤の無添加のものを対象とした。

ついで、えられた反応液中のγ-リノレン酸

量またはアラキドン酸量および菌体から回収したγ-リノレン酸量またはアラキドン酸量を測定し、界面活性剤を添加したばあいの総γ-リノレン酸またはアラキドン酸量(A)と無添加のばあいの総γ-リノレン酸またはアラキドン酸量(B)との比(A)/(B)を用いた菌株名とともに第2表に示す。

第2表より、総γ-リノレン酸および総アラキドン酸量が界面活性剤の添加により著しく増加することがわかる。

[以下余白]

第 2 表

| 菌 株 名 | (A)/(B) |
|-----------------------------|---------|
| リゾプス・ストロニファーIFO 4781 | 1.26 |
| アブシディア・コエルレアIFO 4011 | 1.41 |
| アクチノムコール・レベンスIUT 1049 | 1.18 |
| コアネフォラ・シルシナンスIFO5991 | 1.59 |
| カニンガメラ・エチヌレータ・エレガンスIFO 4441 | 1.55 |
| ビコマイセス・ニテンスIFO 5694 | 1.24 |
| リゾムコール・ミーヘイIFO 9740 | 1.61 |
| ヘリコステラム・ニグリカンスIFO 8091 | 1.46 |
| バエシロマイセス・バリオチIUT 4028 | 1.25 |
| シンセファラストラム・ニグリカンスIUT 1229 | 1.71 |
| サルシネラ・リジダIFO 6411 | 1.30 |
| ゴングロネラ・プトレリIFO 8080 | 1.16 |
| バクセラ・シルシナIFO 9231 | 1.64 |
| ビチウム・デバリアナムIFO 5919 | 1.32 |
| フェネロマイセス・リンデリIFO 6409 | 1.38 |
| アスペルギルス・カンディダスIFO 4309 | 1.50 |
| ペニシリウム・スピヌヒサムIFO 5793 | 1.46 |
| フザリウム・オキソボラムIFO 5942 | 1.49 |
| * ボルビリジウム・クルエンタム | 1.33 |
| * モルティエレラ・エロンガータIFO 8570 | 1.50 |

[注] *印はえられた脂肪酸中のアラキドン酸量を比較した菌株を示す。また*印の付されていない菌株のばあいはγ-リノレン酸量である。

実施例 3

ムコール・アンビガウスIFO 6742を実施例1と同じ培地および同一条件にて実施例1と同じ手順にしたがって振盪培養を行ない、種母を調整した。

ついであらかじめ殺菌された1辺6mmのプロック状ポリウレタンまたはナイロン(いずれも空げき率95~99%、孔数50個/インチ)の微生物保持材料約15,000個を実施例1と同じ培地約8ℓ中で通常の気泡塔にて通気培養を行なった。培養条件としては、pH3~5、温度30℃、通気量約3~5 VVMを用い、非イオン性界面活性剤レオドールTW-0 320(2.0重量%)存在下で7回のくり返し回分培養を行った。

また、同じ気泡塔で界面活性剤無添加(対照)および添加の通常の回分培養を行った。

ついで、えられた総γ-リノレン酸量を測定し、それを培養時間で除したものを生産性とし培養時間、γ-リノレン酸収率とともにその結果を第3表に示す。

第3表より、回分培養の比較から、界面活性剤を添加したばあい、無添加に比べγ-リノレン酸の生産性及び収率がいずれも大きく向上し、さらに固定化法を用いると、生産性がより向上することがわかる。

【以下余白】

第 3 表

| 培養方法 | 培養時間 (hr) | γ-リノレン酸 の生産性 (mg/l · h) | γ-リノレン酸収率 (mg/g-グルコース) |
|----------------------------|-------------------|----------------------------|---------------------------|
| 無固定化法 | | | |
| 回分培養 ^{#1} (対照) | 45 | 6.4 | 9.8×10^{-3} |
| 回分培養 | 45 | 9.8 | 14.0×10^{-3} |
| 固定化法 | | | |
| くり返し回分培養 (ポリウレタン) | 175 ^{#2} | 17.1 | 14.2×10^{-3} |
| くり返し回分培養 (ナイロン) | 190 ^{#2} | 15.4 | 13.9×10^{-3} |

【注】^{#1} 界面活性剤無添加
^{#2} 7回のくり返し回分培養の合計時間

【発明の効果】

本発明にしたがってHLBの値が7以上20以下である非イオン性界面活性剤を添加したばあいには無添加のばあいに比べ脂質を高収量でうることができ、さらに本発明は精製工程の簡素化が可能となることから高純度の脂質を高収量にえられるので工業的に製造するうえできわめて好都合である効果を奏する。

特許出願人 鐘淵化学工業株式会社
代理人弁理士 朝日奈宗太 ほか1名

